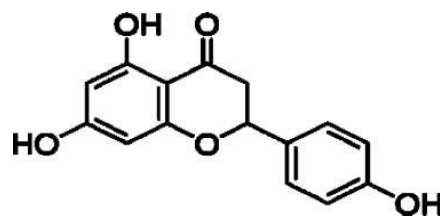


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Naringenin

Naringenin memiliki nama senyawa kimia 5,7-dihidroksi-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one), merupakan salah satu senyawa golongan aglikon flavanon yang banyak ditemukan pada buah jeruk serta memiliki kontribusi yang besar dalam pengembangan farmasi karena aktivitas farmakologinya yang poten (Rani *et al.* 2016). Aktivitas utama Naringenin yaitu sebagai antioksidan yang salah satunya mampu berperan menghambat sitokin penyebab inflamasi seperti TNF- α , IL-6, IFN- γ maupun sebagai immunomodulator (Zeng *et al.* 2018). Sifat-sifat fungsional Naringenin dikaitkan dengan adanya gugus hidroksil dalam strukturnya. Gugus 3-hidroksil pada Naringenin dan Hesperetin menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih baik dalam menghambat sel dibandingkan Naringin dan Hesperidin. Penelitian yang dilakukan He *et al.* (2018) menyatakan bahwa Naringenin dan Hesperitin dalam *Citrus aurantium* L yang diteliti memiliki letak gugus hidroksil yang berbeda dalam menghambat inflamasi. Aktivitas anti inflamasi dihasilkan pada substansi hidroksi di siklus B 40-hydroxy pada Naringenin dan 30-hydroxy-40-methoxy pada Hesperetin. Naringenin dan Hesperitin merupakan bentuk aktif dari glikosida Naringin dan Hesperidin (Kara *et al.* 2014).



Gambar 1. Struktur kimia Naringenin (Vankateswara *et al.* 2017)

Naringenin memiliki kelarutan dalam air dan bioavailabilitas yang rendah ditinjau dari sifat fisika kimianya. Kelarutan Naringenin sebesar 475 mg/L dalam air dengan bioavailabilitas hanya 15% secara oral setelah diabsorpsi melalui mekanisme difusi pasif. Naringenin bersifat padat dengan titik leleh 208-215⁰C,

nilai log P sebesar 2,42 yang menunjukkan nilai lipofilitas dari Naringenin, nilai pKa sebesar 7,05 dan 8,84 serta berat molekul 272,25 (Joshi *et al.* 2018).

Sistem penghantaran obat telah banyak dikembangkan untuk meningkatkan bioavailabilitas Naringenin di antaranya melalui pembuatan *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN) yang dapat meningkatkan bioavailabilitas Naringenin melalui pembentukan *nanocarriers* yang tidak beracun dan stabil dalam penyimpanan. Studi farmakokinetik menunjukkan bahwa bioavailabilitas relatif SLN Naringenin lebih besar 2,53 kali lipat dibandingkan suspensi Naringenin murni dengan ukuran partikel sebesar 98 nm. SLN Naringenin terbukti tidak toksik berdasarkan hasil pengujian 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) dan terbukti stabil pada suhu pendinginan (4°C) dan suhu ruang (25°C) selama 3 bulan. Sistem penghantaran obat dengan *nanocarriers* terbukti mampu meningkatkan bioavailabilitas obat kategori *poorly water soluble drugs* (Wu *et al.* 2016).

Penelitian yang sudah dilakukan kemudian dikembangkan dengan sistem penghantaran obat *self-nanoemulsifying drug delivery system* (SNEDDS) yang mampu meningkatkan bioavailabilitas hingga 11,4 kali dengan ukuran partikel 52 nm (Sandhu *et al.* 2017). SNEDDS mampu menurunkan hambatan metabolisme melalui CYP P450, mengurangi *efflux* P-Glycoprotein dan mengubah fase hepatic menjadi fase limfatik sehingga dapat menghindari *first pass metabolism* dan memiliki potensi meningkatkan bioavailabilitas secara oral (Cherniakov *et al.* 2015).

Solid-SNEDDS merupakan teknik perubahan *liquid-SNEDDS* menjadi bentuk sediaan padat sehingga dapat meningkatkan stabilitas dalam hal penyimpanan, lebih sederhana dan hemat biaya secara manufaktur, lebih mudah dibawa sehingga meningkatkan kepatuhan pasien, dan meningkatkan kelarutan serta pelepasan obat karena luas permukaan antarmuka yang diperbesar (Dash *et al.* 2015). Kerugian dari proses solidifikasi SNEDDS tersebut adalah terjadinya *bulky* akibat penambahan *solid carrier*, dimana hal tersebut dapat diatasi dengan pemilihan komponen SNEDDS dalam bentuk padatan, sehingga penggunaan *solid carier* dapat dihindari (Sharma *et al.* 2018).

dari jaringan limfoid yang berhubungan dengan usus, kemudian nanopartikel melalui rute darah portal akan dibawa ke limfosit. Penargetan obat melalui sistem limfatik mampu mengontrol pelepasan obat, meningkatkan bioavailabilitas obat yang sukar larut dalam air, dan mengurangi iritasi terhadap mukosa saluran cerna (Pathak *et al.* 2018).

Nanoemulsi memiliki profil toksisitas yang berbeda dibandingkan emulsi konvensional karena perbedaan pertimbangan pemilihan sifat bahan yang digunakan untuk memformulasikannya. Pengemulsi berbasis protein, polisakarida, dan fosfolipid sering digunakan dalam pembuatan nanoemulsi dengan pertimbangan bahan tersebut tidak meningkatkan toksisitas karena sudah banyak digunakan dengan konsentrasi yang lebih tinggi pada produk emulsi konvensional. Surfaktan sintetis seperti surfaktan anionik (ester asam laktat), surfaktan kationik (*lauric arginate*), dan surfaktan nonionik (Tween dan Span) dapat meningkatkan iritasi dan toksisitas bila digunakan dalam konsentrasi yang tinggi. Studi kultur sel CaCO₂ melaporkan tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap toksisitas antara nanoemulsi dan emulsi konvensional yang distabilkan oleh berbagai jenis pengemulsi, toksisitas juga tidak dipengaruhi oleh penurunan ukuran droplet. Komponen nanoemulsi seperti kosurfaktan mampu berkontribusi terhadap toksisitas melalui mekanisme peningkatan permeabilitas membran sel, pembukaan *tight junction*, atau mengganggu proses absorpsi sehingga secara tidak langsung dapat mengubah penyerapan komponen bioaktifnya (Wani *et al.* 2018).

Diameter droplet nanoemulsi bergantung dari tipe minyak, konten fase minyak, tipe surfaktan, dan temperatur (Vatsraj *et al.* 2014). Fase minyak yang digunakan akan mempengaruhi ukuran droplet dan stabilitas nanoemulsi yang terbentuk (Davidov-Pardo & McClements. 2015). Fase minyak dalam nanoemulsi berperan sebagai pembawa yang dapat mendispersikan zat aktif yang bersifat lipofilik serta berperan membentuk droplet dalam medium dispersi dengan adanya bantuan surfaktan dan kosurfaktan (Chen *et al.* 2011). Lipid secara efektif diserap melalui berbagai mekanisme didalam saluran cerna. Pendekatan yang layak untuk meningkatkan penyerapan obat dalam saluran cerna adalah dengan memasukkannya ke dalam pembawa lipid karena akan menyebabkan peningkatan

Pembentukan SNEDDS diawali dengan campuran minyak, surfaktan, dan kosurfaktan bertemu fase air dan membentuk lapisan antarmuka melalui agitasi ringan pada saluran cerna. Air menembus lapisan antarmuka sampai ke fase minyak. Penetrasi air menyebabkan terjadinya peningkatan fase kristal cair terdispersi yang jumlahnya dipengaruhi oleh konsentrasi surfaktan. Posisi surfaktan sejajar pada antarmuka minyak dan air untuk mengurangi tegangan antarmuka minyak dan air, kemudian dibantu oleh molekul kecil kosurfaktan yang menembus lapisan surfaktan pada antarmuka minyak dan air, sehingga tegangan antarmuka minyak dan air semakin berkurang dan proses emulsifikasi secara spontan dapat terjadi lebih cepat dengan pembentukan droplet-droplet halus. (Li *et al.* 2018).

Keuntungan yang didapat dari sediaan SNEDDS di antaranya peningkatan ketersediaan hayati zat aktif dalam tubuh melalui penggunaan secara peroral dengan memberikan luas permukaan yang besar pada membran saluran cerna, stabilitas yang tinggi, dapat menurunkan dosis pemberian obat ataupun frekuensi pemakaian sehingga meningkatkan kepatuhan pasien dalam menggunakan obat, memberikan profil absorpsi yang reproduksibel, sangat efektif untuk obat-obat yang memiliki target absorpsi di dalam lambung, melindungi obat yang sensitif terhadap pengaruh lingkungan lambung (Kumar *et al.* 2010). SNEDDS mampu meningkatkan bioavailabilitas obat oral dengan menghindari terjadinya metabolisme lintas pertama di hati yang menyebabkan obat banyak termetabolisme oleh sitokrom P450 dan P34A, akibatnya bioavailabilitas obat menjadi rendah. Obat yang masuk dalam tetesan minyak mampu melindungi obat dari transporter *efflux* P-gp di saluran cerna sehingga memberikan profil farmakodinamik dan farmakokinetik yang lebih baik untuk mendapatkan efek farmakoterapi yang diinginkan (Akhtar *et al.* 2015).

2. Komponen utama SNEDDS (*Self-Nano Emulsifying Drug Delivery System*)

2.1 Minyak. Fase minyak dalam nanoemulsi berperan sebagai pembawa yang dapat melarutkan zat aktif yang bersifat hidrofobik dan membentuk droplet dalam medium dispersi dengan bantuan surfaktan dan kosurfaktan (Chen *et al.*

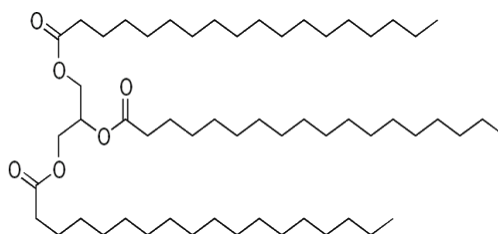
2011). Minyak mampu meningkatkan transportasi obat lipofil melalui sistem limfatik dan meningkatkan waktu pengosongan perut, sehingga obat dapat bertahan lebih lama di usus untuk diabsorpsi. Minyak juga membantu menginduksi cairan empedu dan pankreas yang dapat menyebabkan pembentukan campuran misel melalui garam empedu, fosfolipid, dan kolesterol sehingga dapat meningkatkan kapasitas saluran cerna untuk mengabsorpsi obat (Krstić *et al.* 2018).

Pemilihan minyak dalam formulasi SNEDDS tergantung pada besarnya kelarutan obat dan sifat fisikokimia, termasuk besarnya tegangan antarmuka dengan fase air, viskositas, kepadatan, karakteristik fase yang dihasilkan, dan polaritas (Li *et al.* 2018). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Jaworska *et al.* (2013) menyatakan semakin polar fase minyak yang digunakan dalam pembuatan nanoemulsi, maka ukuran droplet yang terbentuk akan jauh lebih besar dibandingkan ukuran droplet yang dihasilkan dengan menggunakan fase minyak non-polar. Stabilitas penyimpanan dari sediaan nanoemulsi dapat dipengaruhi oleh fase minyak yang digunakan karena memiliki pengaruh dalam aspek polaritas dan kelarutan molekul minyak dalam air. (Pardo & McClements. 2014).

Minyak nabati banyak dipilih dalam formulasi karena lebih mudah didegradasi oleh mikroorganisme sehingga lebih ramah lingkungan. Minyak nabati yang umum digunakan dalam formulasi SNEDDS yaitu *olive oil*, *corn oil*, *soya bean*, dan *virgin coconut oil* (Patel *et al.* 2010). Struktur molekul minyak berdampak pada kemampuan emulsinya. Minyak nabati adalah campuran trigliserida dengan panjang rantai dan tingkat kejenuhan yang berbeda-beda. Trigliserida dibagi menjadi trigliserida rantai pendek (kurang dari 5 atom C), rantai sedang (6-12 atom C), dan rantai panjang (lebih dari 12 atom C). Titik leleh minyak dan kerentanan terhadap oksidasi akan meningkat dengan peningkatan panjang rantai asam lemak. Trigliserida rantai sedang lebih sering digunakan karena memiliki kemampuan pelepasan obat yang lebih besar sehingga penyerapan obat lebih cepat dibandingkan trigliserida rantai panjang. Trigliserida rantai sedang dibentuk oleh esterifikasi asam lemak terfraksinasi dari minyak kelapa (Krstić *et al.* 2018). Trigliserida rantai sedang secara langsung diangkut

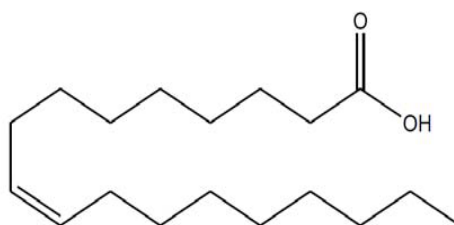
oleh darah portal ke sirkulasi sistemik dan jika lipofilitas cukup (yaitu $\log P \geq 4.5$) maka sistem berbasis trigliserida rantai sedang mampu mendukung transport limfatik. Trigliserida rantai panjang meningkatkan transport limfatik dari obat lipofilik melalui limfatik usus sehingga meningkatkan bioavailabilitas oral (Bandyopadhyay *et al.* 2012).

2.1.1 Stearin. Stearin atau *glycerol tristearate* merupakan fraksi padat dari *Crude Palm Oil* (CPO) yang diperoleh melalui proses fraksinasi kering. Fraksinasi yaitu proses pemisahan trigliserida yang terdapat pada minyak kelapa sawit berdasarkan titik lelehnya. Trigliserida yang memiliki titik leleh lebih rendah akan mengkristal dan terpisah menjadi 2 fraksi yaitu fraksi cair dan fraksi padat. Stearin banyak mengandung asam lemak oleat (C18:1) sebesar 15,6-37 % (Braipson & Gibon. 2007).



Gambar 4. Struktur kimia Stearin (PubChem. 2018)

Asam oleat (*cis*-9-octadecenoic acid, oleinic acid) tersusun dari 18 atom C dengan satu ikatan rangkap diantara atom C ke-9 dan ke-10 yang membuat asam ini memiliki kapasitas yang besar dalam pembentukan dispersi yang tinggi. Asam oleat termasuk dalam trigliserida rantai panjang yang memiliki kemampuan sebagai pembawa obat lipofilik melauai transport limfatik sehingga mampu menghindari terjadinya metabolisme lintas pertama di hati yang menyebabkan rendahnya bioavailabilitas (Bandyopadhyay *et al.* 2012).



Gambar 5. Struktur kimia Asam Oleat (Rowe *et al.* 2009)

Asam lemak oleat pada suhu ruangan berupa cairan kental dengan warna kuning pucat atau kuning kecoklatan serta memiliki aroma yang khas. Asam oleat tidak larut dalam air, titik leburnya $5,3^{\circ}\text{C}$ dan titik didihnya 36°C (Rowe *et al.* 2009). Asam lemak oleat mampu melarutkan obat yang bersifat lipofil sehingga dapat digunakan dalam sediaan SNEDDS. Asam oleat banyak dipilih sebagai fase minyak dalam formulasi SNEDDS karena kemampuan *self-emulsifying* yang tinggi dan kapasitas *drug loading* yang besar (Kurakula dan Miryala. 2013)

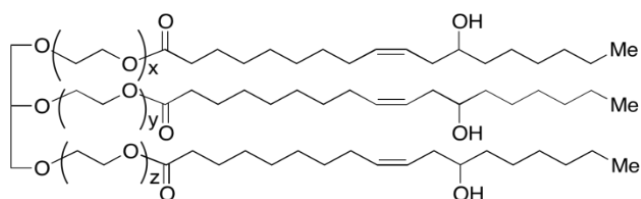
2.2 Surfaktan. Surfaktan merupakan senyawa yang memiliki gugus hidrofilik pada bagian kepala dan hidrofobik pada bagian ekor. Surfaktan dipilih dengan berbagai pertimbangan. Nilai *Hydrophylic-Lipophylic Balance* (HLB) dan nilai *oil phase* dapat dijadikan pertimbangan dalam pemilihan surfaktan. Nilai HLB berkisar antara 0-20, semakin tinggi nilai HLB maka semakin bersifat hidrofilik dan sangat mudah terdispersi dalam air, sehingga dapat membentuk nanoemulsi tipe minyak dalam air (Debnath *et al.* 2011). Surfaktan dengan nilai HLB tinggi dapat menjaga obat yang terdispersi bertahan dalam waktu yang lama dalam organ pengabsorpsi dan mencegah pengendapan obat dalam saluran cerna (Kohli *et al.* 2010).

Berdasarkan tipe ionisasi dalam air, surfaktan dapat diklasifikasikan ke dalam empat kelas yaitu surfaktan anionik, kationik, amfoterik, dan non-ionik (Nielloud dan Marti. 2000). Surfaktan nonionik umumnya lebih bersifat tidak toksik dibanding surfaktan ionik. Surfaktan nonionik tidak terpengaruh oleh pH dan perubahan kekuatan ion sehingga lebih aman dan kompatibel (Azeem *et al.* 2009). Surfaktan nonionik dapat menghambat fungsi P-gp di usus sehingga mampu meningkatkan bioavailabilitas obat oral (Akhtar *et al.* 2015). Surfaktan nonionik stabil dalam berbagai kondisi pH karena tidak dipengaruhi oleh gaya elektrostatis sehingga mampu meningkatkan stabilitas nanoemulsi. Surfaktan ionik kestabilannya dipengaruhi oleh nilai pH yang dapat mengakibatkan surfaktan mengalami perubahan muatan dan membuat nanoemulsi menjadi tidak stabil (Feng *et al.* 2018).

Surfaktan memiliki peranan penting dalam pembentukan nanoemulsi dengan menurunkan tegangan antarmuka antara fase minyak dan air. Mekanisme

penambahan surfaktan dapat menyebabkan tegangan antarmuka akan turun dengan sangat cepat hingga mencapai titik tertentu yang dikenal dengan CMC (*Critical Micelle Concentration*) dan saat mencapai titik tersebut tegangan antar muka tidak akan berkurang lagi. Surfaktan yang bersifat amfilik dapat melarutkan jenis obat hidrofobik dalam jumlah banyak (Sapra *et al.* 2012). Komposisi surfaktan dalam formulasi SNEDDS tidak boleh terlalu banyak karena dapat mengakibatkan iritasi saluran cerna dan terbentuknya *misscel*. Rasio volume surfaktan di atas 60% dalam formulasi SNEDDS dapat menyebabkan kegagalan pembentukan sistem *self-emulsification* karena peningkatan energi bebas. Energi bebas yang terlalu besar akan menurunkan stabilitas nanoemulsi (Li *et al.* 2018).

2.2.1 Kolliphor EL. Kolliphor EL juga dikenal sebagai Cremophor EL atau *Polyoxyl 35 hydrogenated castor oil* adalah trigliserida polietoksilat yang dibuat dengan mereaksikan minyak jarak terhidrogenasi dengan etilen oksida. Minyak jarak adalah minyak nabati yang mengandung trigliserida dengan asam ricinoleat (asam 2-hidroksi-9-cis-octadecenoic) dan jumlah asam oleat dan linoleat yang lebih kecil. *Polyoxyl 35 castor oil* telah digunakan untuk meningkatkan permeabilitas peptida di *monolayers* sel CaCO_2 dengan menghambat sistem penghabisan apikal terpolarisasi, meningkatkan penyerapan usus dari beberapa obat (Rowe *et al.* 2009).



Gambar 6. Struktur kimia Cremophor-EL (PubChem. 2018).

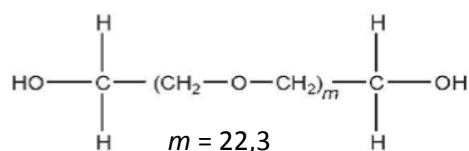
Kolliphor EL merupakan surfaktan nonionik dengan rantai C panjang, sehingga bersifat lipofil dan memiliki nilai HLB 13,5 yang cocok digunakan sebagai surfaktan dalam formulasi SNEDDS karena mampu membentuk nanoemulsi tipe minyak dalam air dengan mudah. Surfaktan dapat bekerja lebih optimal dengan adanya penambahan kosurfaktan (Gupta *et al.* 2010).

2.3 Kosurfaktan. Kosurfaktan merupakan molekul kecil bersifat amfilik, sebuah alkohol rantai pendek hingga medium (C2-C10). Surfaktan yang bekerja sendiri tanpa penambahan kosurfaktan dianggap kurang optimal dalam

menghasilkan emulsi berukuran nano. Penambahan kosurfaktan dapat membantu menghasilkan tegangan antarmuka mendekati nol. Tegangan antarmuka yang mendekati nol mengakibatkan diameter globul menjadi sangat kecil (Lawrence dan Rees. 2000)

Penggunaan kosurfaktan selain dapat membantu kerja surfaktan dalam menurunkan tegangan antarmuka juga dapat meningkatkan stabilitas nanoemulsi dan meningkatkan pergerakan ekor hidrokarbon sehingga penetrasi minyak pada bagian ekor menjadi lebih besar (Gupta *et al.* 2010). Molekul kosurfaktan akan terselip dan membentuk ruang kosong di antara surfaktan sehingga strukturnya akan membesar tetapi memiliki fluiditas yang tinggi dan mampu membentuk nanoemulsi lebih cepat. Kosurfaktan ditambahkan pada formula SNEDDS untuk mempercepat waktu emulsifikasi dan mengatur ukuran droplet pada nanoemulsi (Makadia *et al.* 2013).

2.3.1 Polietilen Glikol 1000 (PEG 1000). PEG 1000 berupa padatan dengan bobot molekul 950-1050. Polietilen Glikol juga dapat digunakan untuk meningkatkan pelepasan obat yang tidak larut larut dalam air dengan dibuat dalam bentuk dispersi padat. PEG 1000 dipilih sebagai kosurfaktan karena memiliki nilai viskositas yang lebih rendah dibandingkan PEG padat lainnya, sehingga diharapkan dapat membantu menurunkan *emulsification time* (Rowe *et al.* 2009). PEG 1000 memiliki nilai HLB sebesar 15,6 sehingga memenuhi persyaratan sebagai kosurfaktan pada formulasi SNEDDS karena semakin tinggi nilai HLB semakin mudah membentuk nanoemulsi minyak dalam air (Kommuru *et al.* 2001).



Gambar 7. Struktur kimia PEG 1000 (Rowe *et al.* 2009)

D. *Solid Self Nano-emulsifying Drug Delivery System* (S-SNEDDS)

Solid SNEDDS merupakan bentuk sistem penghantaran obat berbasis lipid yang dibuat dengan proses pemadatan (solidifikasi). Bentuk sediaan *solid*

SNEDDS merupakan modifikasi dari SNEDDS karena menggabungkan keunggulan SNEDDS dan sediaan padatan (Nazzal dan Khan. 2006; Wang *et al.* 2008). Keunggulan *solid* SNEDDS dibandingkan dengan SNEDDS yaitu penggabungan fase cair dan fase padat dapat meningkatkan absorpsi sehingga bioavailabilitas obat meningkat, keterulangan bioavailabilitas lebih seragam, dan dalam bentuk padat memiliki stabilitas yang lebih tinggi (Kang *et al.* 2011).

Teknik solidifikasi yang dapat diterapkan untuk mengubah SNEDDS menjadi *solid* SNEDDS di antaranya adalah *spray dring*, *melt granulation*, *melt extrusion*, *raotary evaporator*, *freeze dry*, dan *adsorption to solid carrier* (Mohanrao *et al.* 2011). Permasalahan yang timbul saat ditambahkan *solid carrier* adalah terjadinya *bulky* sehingga ukuran partikel berubah menjadi besar, tidak berada dalam kisaran ukuran nano. Penambahan *solid carrier* dalam formula SNEDDS dapat dihindari dengan mengganti komponen minyak, surfaktan, dan kosurfaktan dalam bentuk padatan untuk membentuk S-SNEDDS.

1. Parameter *solid* SNEDDS

Hasil akhir formulasi *solid* SNEDDS dapat dinilai kualitasnya berdasarkan beberapa parameter. Parameter tersebut antara lain *emulsification time*, persen transmittan, uji difusi, dan uji disolusi. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali pada masing-masing pengujian.

1.1 *Emulsification time.* *Emulsification time* menggambarkan waktu yang dibutuhkan *solid* SNEDDS untuk membentuk nanoemulsi ketika bertemu dengan cairan di saluran cerna. *Self-emulsification time* mengacu pada *dispersibility test* standard USP XXII *dissolution apparatus 2* menggunakan media air pada suhu 37⁰C dengan putaran *paddle* 50 rpm.

Emulsification time terbagi kedalam 5 *grade* berdasarkan tampilan visual dan waktu yang dibutuhkan untuk membentuk emulsi. *Grade A* memberikan tampilan visual jernih seperti air dengan waktu yang dibutuhkan kurang dari 1 menit. *Grade B* memberikan tampilan visual sedikit jernih – kebiruan. *Grade C* memberikan tampilan visual putih susu (*fine milky*) dengan waktu yang dibutuhkan selama 2 menit. *Grade D* memberikan memberi tampilan visual keruh (*grayish-white*), terlihat sedikit bagian minyak pada permukaan media, waktu

yang dibutuhkan selama 2 menit lebih. *Grade E* memberikan tampilan droplet minyak yang besar pada bagian permukaan media. Nanoemulsi yang baik memberikan visual seperti yang dikategorikan pada *grade A* (Rahul *et al.* 2012).

1.2 Persen transmittan. Pengujian persen transmittan merupakan parameter sifat fisik nanoemulsi yang penting. Persen transmittan bertujuan untuk mengukur tingkat kejernihan dan memastikan tidak terjadi pemisahan pada sistem nanoemulsi. Pengujian ditentukan dari hasil pengujian *emulsification time* kemudian diuji menggunakan spektrofotometer UV-VIS dan dianalisis pada panjang gelombang 633 nm dengan aquadestilata sebagai blangko. Sampel tersebut dinyatakan memiliki kejernihan seperti air apabila nilai persen transmittan yang didapat mendekati 100% (Patel *et al.* 2011).

1.3 Uji Disolusi. Pelepasan obat di dalam tubuh dapat diketahui dengan uji disolusi atau kelarutan. Uji disolusi dilakukan untuk mengetahui gambaran pelepasan Naringenin dalam suatu sediaan *solid SNEDDS* hingga tercapainya suatu efek terapi pada waktu tertentu. Hasil uji disolusi *solid SNEDDS* Naringenin digambarkan dengan suatu grafik antara waktu dengan persen disolusi obat yang terdisolusi dalam medium dapar HCl 0,1 N yang menggambarkan profil pelepasan obat secara *in vitro* (USP. 2015).

1.4 Uji Difusi dengan dialysis bag. Persen terdisolusi dengan menggunakan *dialysis bag* dari *solid SNEDDS* Naringenin yang dihasilkan dapat digunakan untuk mengetahui jumlah Naringenin yang dapat menembus membran dalam setiap waktu, sehingga dapat dihitung parameter farmakokinetika dari sediaan tersebut. Peningkatan persen terdifusi dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan membran dialysis dan larutan dapar phospat buffer saline (pH 7,4) sebagai pengganti cairan darah.

Penggunaan membran dialysis sebagai media uji karena membran dialysis memiliki ukuran pori sebesar 330 nm, hampir serupa dengan dengan membran mukosa yaitu sebesar 240 – 270 nm (Dash *et al.* 2010). Suhu selama proses difusi disesuaikan dengan suhu tubuh yaitu $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Perubahan suhu harus dijaga karena dapat mempengaruhi perubahan laju difusi sediaan dalam menembus membran (Sinko. 2006).

E. Validasi Metode Analisis

Validasi metode adalah proses yang digunakan untuk mengonfirmasi bahwa prosedur analitik yang digunakan untuk pengujian tertentu cocok untuk penggunaan yang dimaksudkan. Hasil dari metode validasi dapat digunakan untuk menilai kualitas, keandalan, dan konsistensi hasil analitis (Sharma. 2012). Peran validasi metode dalam pencapaian hasil yang dimaksudkan diantaranya adalah untuk memasukkan semua efek atau faktor pengaruh pada hasil akhir, untuk membuatnya dapat dilacak ke referensi yang dinyatakan dalam metode referensi, bahan referensi, atau *Internasional System of Units (SI)*, dan untuk mengetahui ketidakpastian yang terkait dengan masing-masing pengaruh dan referensi (Taverniers *et al.* 2010). Parameter analitik yang diperlukan untuk validasi dapat bervariasi bergantung pada tipe prosedur analitik. Metode yang digunakan untuk pemeriksaan produk farmasetika dapat diklasifikasikan seperti di bawah ini :

- a. Kategori I : metode analitikal untuk kuantitasi komponen maupun substansi bahan baku obat atau bahan aktif (termasuk pengawet) pada hasil akhir farmasetika termasuk dalam kategori I.
- b. Kategori II : Metode analitik untuk menentukan campuran dalam substansi bahan baku atau komponen sisa pada produk akhir farmasetika dimasukkan dalam kategori II. Metode ini termasuk perhitungan kembali secara kuantitatif dan batas tes.
- c. Kategori III : Metode analitik ini untuk menentukan performa karakteristik (contoh: disolusi, pelepasan obat) termasuk dalam kategori III.

Tabel 1. Parameter analitik yang harus dipertimbangkan untuk tipe prosedur analitik yang berbeda

Parameter Performa Analitik	Kualitatif (ID)	Perhitungan kembali Kategori I	Perhitungan kembali Kategori II		Perhitungan Kembali Kategori III
			Kuantitatif	Batas tes	
Akurasi	tidak	Ya	ya	*	*
Presisi	tidak	Ya	ya	tidak	ya
Spesifisitas	ya	Ya	ya	ya	*
Batas deteksi	ya	tidak	tidak	ya	*
Batas kuantitasi	tidak	tidak	ya	tidak	*
Linearitas	tidak	Ya	ya	tidak	*

Penelitian ini termasuk kedalam kategori 1 dengan parameter validasi metode analisis yang digunakan yaitu linearitas, akurasi, dan presisi.

1. Akurasi

Akurasi merupakan kedekatan hasil uji antara hasil yang diperoleh dengan nilai sebenarnya atau dengan nilai referensinya (Chan *et al* 2004). Akurasi menggambarkan kesalahan sistematik dari suatu hasil pengukuran. Berbagai macam kesalahan yang mungkin terjadi meliputi kelembapan, bahan referensi serta metode analisis. Akurasi dapat dinyatakan sebagai persen kembali analit yang ditambahkan sedangkan nilai akurasi dapat dinyatakan dengan persen perolehan kembali (*persen recovery*). Nilai perolehan kembali yang diterima antara 85-115% (*Association of Official Analytical Chemists* 2002).

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Kadar hasil analit}}{\text{Kadar sesungguhnya}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

2. Presisi

Presisi merupakan suatu ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji dengan cara memperoleh pengukuran dari penyebaran hasil jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran homogen. Diukur sebagai simpanan baku atau simpanan relatif (koefisien variasi). Akurasi dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Dikatakan seksama jika metode memberikan simpangan baku relative yaitu $\leq 2\%$ (Chan *et al.* 2004).

F. Factorial Design

Factorial design merupakan desain yang digunakan untuk mengukur efek dari beberapa faktor dan interaksi antara faktor-faktor tersebut. Faktor merupakan variabel bebas yang telah ditentukan dalam suatu penelitian. Level dari faktor merupakan nilai yang ditentukan untuk masing-masing faktor (Bolton. 1997). Penggunaan *factorial design* untuk mengidentifikasi faktor-faktor penting yang berpengaruh terhadap suatu produk atau proses. Pendekatan DOE berupa *mixture design* dapat membantu menemukan formula optimum dengan serangkaian campuran suatu komponen yang telah ditetapkan sedangkan *response surface* 26

model (RSM) berguna untuk pengaturan proses yang ideal untuk mendapatkan performa optimum (Hendy. 2007).

Metode *factorial design* memiliki beberapa keuntungan dalam mendesain percobaan. Keuntungan dari *factorial design* ini yaitu, metode ini memungkinkan untuk mengidentifikasi efek masing-masing faktor, maupun efek interaksi antar faktor. Metode ini ekonomis serta mengurangi jumlah penelitian jika dibandingkan dengan meneliti dua efek faktor secara terpisah (De Muth. 1999).

Factorial design tiga level dan dua faktor diperlukan sembilan percobaan ($3n$, dengan 3 adalah level dan n adalah jumlah faktor). Tingkat ini dinyatakan sebagai -1 , 0 , dan $+1$. Keuntungan *factorial design* ini adalah dapat memperkirakan efek dominan dalam menentukan respon jika tidak ada interaksi yang terjadi. Interaksi yang timbul pada metode ini memungkinkan untuk mengungkapkan dan mengidentifikasi interaksi yang ada. Kesimpulan dapat diaplikasikan pada rentang kondisi yang lebar karena efek dari faktor ditentukan melalui variasi level dari faktor-faktor lain (Bolton. 1997).

G. Landasan Teori

Solid SNEDDS merupakan modifikasi dari SNEDDS yaitu campuran homogen isotropik dari senyawa aktif, minyak, surfaktan, dan kosurfaktan yang membentuk nanoemulsi minyak dalam air setelah adanya agitasi ringan akibat pergerakan dalam saluran cerna dan memiliki ukuran droplet 10-100 nm. Formulasi SNEDDS stabil secara termodinamik (Krsti. 2018). Nanoemulsi yang terbentuk secara spontan di saluran pencernaan akan mengubah obat dalam bentuk terdispersi dalam droplet minyak sehingga meningkatkan pelepasan dan absorpsi obat akibat besarnya luas permukaan antarmuka.

Pembuatan *solid* SNEDDS dilakukan dengan mencampurkan Stearin, surfaktan Kolliphor EL, kosurfaktan PEG 1000 dengan Naringenin sebagai obat tanpa adanya penambahan *solid carrier*. Asam lemak tak jenuh pada Stearin mampu meningkatkan bioavailabilitas obat lipofilik dengan meningkatkan kemampuan absorpsi obat tersebut. Penambahan campuran surfaktan Kolliphor EL mampu menurunkan tegangan antarmuka minyak dan air serta PEG 1000

sebagai kosurfaktan yang membantu surfaktan dalam menjaga stabilitas lapisan film antara minyak dan air.

Nanoemulsi yang dikatakan berhasil dalam penelitian memenuhi karakteristik dari parameter *emulsification time*, persen transmitan, uji difusi, dan uji disolusi. *Emulsification time* dengan waktu yang kurang dari 1 menit pada media aquadestilata, AIF dan AGF. Stabilitas nanoemulsi yang dihasilkan selama minimal 4 jam pada media aquadestilata, AIF dan AGF pada suhu 27°C dan 37°C. Profil disolusi dan disolusi dengan membran dialysis *solid* SNEDDS Naringenin harus lebih besar dibandingkan Naringenin murni (Singh *et al.* 2009).

H. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian dapat disusun berdasarkan permasalahan yang ada, yaitu,

Pertama, Pada proporsi 1 bagian Stearin dan 4 bagian Kolliphor-El mampu membentuk formulasi basis *solid* SNEDDS Naringenin yang optimum ditinjau dari parameter *emulsification time*, persen transmitan, profil disolusi, dan difusi.

Kedua, Kolliphor-EL dalam *solid* SNEDDS Naringenin mampu memberi pengaruh terhadap hasil uji disolusi dan persen transmitan, sedangkan Stearin mampu memberi pengaruh terhadap *emulsification time* dan hasil uji difusi *solid* SNEDDS Naringenin.